

Title	Chemical Biology Approaches for the Molecular Recognition of DNA Double Helix(Abstract_要旨)
Author(s)	Abhijit, Saha
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2015-03-23
URL	http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k18807
Right	学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2016/01/30に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

(続紙 1)

京都大学	博 士 (理 学)	氏名	Abhijit Saha
論文題目	Chemical Biology Approaches for the Molecular Recognition of DNA Double Helix (DNA二重らせんの分子認識に関するケミカルバイオロジー研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>For several years DNA minor groove recognition is of great interest for developing new drugs since it is a site of non-covalent high sequence specific interactions for a large variety of organic small molecules including natural products. DNA also provides a platform for developing detection technique of biologically significant processes by suitable changes in it. Here in this thesis the molecular recognition of DNA double helix was performed by various chemical biology approaches using small molecules and proteins.</p>			
<p>1. A dual functioning synthetic transcriptional activator encompassing DNA minor groove binding sequence specific pyrrole imidazole polyamide (PIP) and a chromatin modifying histone deacetylase inhibitor SAHA (suberoyl anilide hydroxamic acid), known as SAHA-PIP δ can target predetermined DNA sequence, 5'-WGWWC-3' (W = A/T), in the minor groove along with HDAC inhibition which releases the tight chromatin structure to aid easy access of transcription factor. It has been found that this small molecule could activate some of the core induced pluripotent stem cell regulated genes (<i>Oct3/4</i>, <i>Nanog</i>, <i>Rex1</i>, <i>Cdh1</i>, <i>Sox2</i>, and <i>Dppa4</i>) in mouse embryonic fibroblast. Interestingly, a modification in the SAHA unit of SAHA-PIP δ changes its HDAC activity towards HDAC8 and activated HDAC8 controlled <i>Otx2</i> and <i>Lhx1</i>.</p>			
<p>2. Effort has been given in the present study to enhance the efficacy of SAHA-PIP δ and focused on improving the cellular uptake in cell culture medium. It was found that the biological activity of SAHA-PIP δ got significantly ($P= <0.05$) improved against the core pluripotency genes after the incorporation of an isophthalic acid (IPA) on its C-terminus.</p>			
<p>3. Thymine residues can be easily replaced with its isosteric analogue 5-bromouracil (^{Br}U) and resulting DNA remain functional in vivo. This replacement greatly sensitizes DNA to damage induced by the action of UV source. In this study, pyrene conjugated pyrrole imidazole polyamide (pyrene-PIP) was designed to inject electron in a sequence specific manner using ^{Br}U substituted DNA under photo irradiation condition. The electron injection at the predetermined sites in the long DNA fragment proved that ^{Br}U substituted DNA are useful as an assay for detecting binding sites of DNA binding small molecule.</p>			
<p>4. Recently, micro irradiation technology has been used to detect the recruitment of double break checkpoint factors such as H2AX-P and repair proteins such as 53BP1 on the damage sites. In micro irradiation before passing the laser beam (364 nm) on the cells there is a need of labelling</p>			

the cells with 5-bromouracil followed by staining with Hoechst 33258 to cause double strand break. However, no such studies available which could explain the mechanistic role of Hoechst 33258 in DNA damage. The present study confirms the mechanistic pathway of DNA damage by Hoechst 33258 in UVA micro irradiation technology.

5. Transcription factors generally bind to the predetermined DNA sequences and form multi-protein complexes during transcription. One such example is the cooperative binding partnership between Sox2 and Pax6 at the DC5 enhancer region by which they regulate the expression of the δ -crystallin gene, which plays a pivotal role in eye development during late embryogenesis. It was known proteins which contain tryptophan can donate electron under photo irradiation condition and interestingly these two proteins (Sox2 & Pax6) contain tryptophans. Thus, it was proposed to see electron transfer from both the protein and their cooperative binding affinity on DC5. The results suggest that both of them can transfer electron at their binding sites however for electron transfer from Pax6 there is a need of Sox2 which clearly indicate cooperative binding affinity. This is the first time showing a biologically significant process of accumulation of multi protein complex/cooperative binding by electron transfer.

Combing all, these studies are done very carefully using small molecules and proteins to understand their binding affinity on double stranded DNA. All these studied are important and have future application in the development of regenerative medicine, and also as a detection technique to identify various mechanistic details using the photochemistry of ^{Br}U labelled DNA.

(論文審査の結果の要旨)

DNA 二重鎖分子認識のためのケミカルバイオロジック的アプローチ

DNA の副溝は、天然物を含め様々な有機小分子が DNA と非共有結合的に相互作用をする部位である。このため、DNA の副溝の認識は新薬の開発において長い間、注目を集めてきた。DNA は、少し修飾を加えるだけで、生物学的に重要なプロセスを検出する技術開発のためのプラットフォームとなりえる。この論文では、様々なケミカルバイオロジック的アプローチを用いて、有機小分子からタンパク質を対象に、DNA 二重鎖の分子認識について研究を行った。

1. 申請者は配列特異的に DNA の副溝に結合する分子である pyrrole-imidazole polyamide (PIP) にヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤である suberoyl anilide hydroxamic acid(SAHA)を導入して、遺伝子の転写を活性化する SAHA-PIP を開発した。例えば、SAHA-PIP δ と呼ばれる分子は 5'-WGWWC-3' (W = A/T) という DNA の配列に結合し、HDAC の活性を阻害することで、かたいクロマチン構造を緩ませて、転写を活性化することができる。申請者はマウス胎仔線維芽細胞をこの SAHA-PIP δ で処理したときに、iPSC 化に関わる遺伝子群 (*Oct3/4*, *Nanog*, *Rex1*, *Cdh1*, *Sox2*, *Dppa4*) の発現量が増加することを示した。又、SAHA の部分に修飾を加えることで、HDAC8 に対する阻害の活性に変化が生じ、HDAC8 によって制御されている遺伝子である *Otx2* と *Lhx1* の発現量が増加することを示した。
2. 続いて、培養している細胞への SAHA-PIP δ の取り込みを増加させることで、遺伝子発現量の増加効果のさらなる向上を試みた。PIP の細胞膜透過性を高めるために、isophthalic acid (IPA) を PIP の C 末端に導入することで、iPSC 化に関わる遺伝子群の発現量がさらに上昇することを示した。
3. 申請者は、全ての thymine を 5-bromouracil に置き換えた二本鎖 DNA は様々な目的に用いることができることを示した。この 5-bromouracil 置換 DNA は、通常の DNA よりも、紫外線照射による損傷を受けやすい。この 5-bromouracil 置換 DNA と、電子供与性分子である pyrene を導入した PIP(pyrene-PIP)を用いて、pyrene-PIP が紫外線照射により、配列特異的に DNA に電子を注入することを示した。これにより、5-bromouracil 置換 DNA が、DNA 結合性分子の結合部位を決定するのに有用であることを明らかにした。
4. 続いて、この方法を用いて、DNA 結合性分子である Hoechst 33258 が結合する DNA 配列を決定した。最近では、H2AX-P といったチェックポイント因子や、53BP1 といった修復酵素が DNA 二本鎖切断損傷部位に結合するということが、顕微照射法によって示された。顕微照射法では、細胞に 364 nm のレーザー光を照射する前に、細胞を Hoechst 33258 で処理して、DNA 二本鎖切断が起こりやすくするようにしておく必要がある。しかし、どのような機序によって Hoechst

33258 が DNA 二本鎖切断を誘導するのかは分かっていなかった。申請者は UVA 顕微照射法を用いて、Hoechst 33258 による DNA 損傷誘導のメカニズムを明らかにした。

5. 申請者は、Sox2 や Pax6 といった転写因子を用いて、二本鎖 DNA の分子認識の機構を明らかにしようと試みた。転写因子は一般的に特定の DNA 配列に結合し、転写の際にはタンパク質複合体を形成する。Sox2 と Pax6 は、胚発生後期において目の形成のために重要な役割を担っている遺伝子である *δ-crystallin* の発現量を制御している。又、Sox2 と Pax6 は DC5 エンハンサー部位に結合する。これら二つの転写因子が DNA 結合ドメインに tryptophan 残基を持っているため、紫外線照射により、DNA への電子注入が起こることが予想される。この性質を用いることで、二つの転写因子が DC5 エンハンサー部位へ共役的に結合するということを示すことができる。検討の結果 Sox2 と Pax6 を共に用いたときに、DNA への電子注入が起こることを確認できた。又、Sox2 がなくても、Pax6 だけで DNA への電子注入が起こることも示した。これらの結果、タンパク質複合体形成の重要な過程を、電子移動を用いることで、初めて示すことができた。

本研究では有機小分子とタンパク質を用いて、二本鎖 DNA との相互作用についてケミカルバイオロジーによる検討を行った。ここで行った研究結果は、医薬品開発のための足掛かりともなりえる。又、5-bromouracil 置換 DNA を用いることで、様々な分子の DNA への結合を明らかにすることも示した。

以上、本論文では、遺伝子の転写を活性化する HDAC インヒビター SAHA-ピロール・イミダゾールポリアミド PIP を合成し、その評価を行った。さらに、PIP の細胞膜透過性を高めるために、isophtalic acid(IPA)を PIP の C 末端に導入することで、iPSC 化に関わる遺伝子群の発現量をさらに上昇させることに成功した。thymine を 5-bromouracil に置き換えた二本鎖 DNA を用いて、新しい小分子やタンパクの結合を決定する方法を開発した。これらの申請者の成果は、高い有機合成化学技術と生化学的な解析手法を用いることで成し遂げられたものであり、従来の方法では技術的に成しえなかったものである。これらの成果は核酸のケミカルバイオロジーの研究領域で新規なものであり、大きなインパクトを持つ。これらの配列特異的な遺伝子発現法は細胞生物学など多方面で活用可能であり、将来の応用性も高い研究である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 27 年 1 月 15 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降